



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

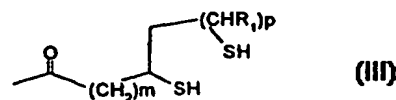
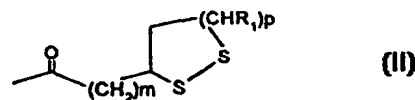
|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :<br>A61K 47/48, 7/48   |  | A1   | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/32235 |
|   |  | (43) Internationales<br>Veröffentlichungsdatum:  | 8. Juni 2000 (08.06.00)                                  |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH99/00567<br>(22) Internationales Anmeldedatum: 26. November 1999 (26.11.99)<br>(30) Prioritätsdaten: 2354/98 26. November 1998 (26.11.98) CH<br>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PEN-TAPHARM AG [CH/CH]; Engulgasse 109, CH-4054 Basel (CH).<br>(72) Erfinder; und<br>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): IMFELD, Dominik [CH/CH]; Peter Rot-Strasse 109, CH-4058 Basel (CH). LUDIN, Christian [DE/CH]; Gempenring 4, CH-4147 Aesch (CH). SCHREIER, Thomas [CH/CH]; Ahornstrasse 6, CH-4416 Bubendorf (CH).<br>(74) Anwalt: BRAUN, André; Braun & Partner, Reussstrasse 22, CH-4054 Basel (CH). |  | (81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br>Veröffentlicht<br>Mit internationalem Recherchenbericht. |  |

(54) Title: TRANSPORT SYSTEM CONJUGATE

(54) Bezeichnung: TRANSPORTSYSTEMKONJUGATE

(57) Abstract

The invention relates to a transport system conjugate serving as transmembrane transport system, consisting of at least one pharmaceutically and/or cosmetically active compound, said compound being modified in such a way that it contains at least one of the substituents of formula (I)  $-Y-(NH-C_6H_4-NH)-C(O)-R$  and at least one Y bonded substituent of formula (II) and/or (III), wherein Y represents a radical of an amino acid originally having at least 3 reactive groups or a radical of 2 or 3 amino acids bonded to each other originally having at least 3 reactive groups selected from amino  $(-NH_2)$  and/or carboxyl  $[-C(O)OH]$ , or a trivalent radical of a trisamin with 2-8 C atoms,  $C_6H_4-NH-CH_2CH_2CH_2-$  or  $-CH_2CH_2-$ , preferably  $-CH_2CH_2-$ , r represents zero or one, preferably 1, R-C(O) represents the radical of a saturated, monounsaturated or polyunsaturated, optionally substituted  $(C_4-C_{24})$  fatty acid, R<sub>1</sub> represents hydrogen or alkyl with 1, 2, 3 or 4 C atoms, preferably hydrogen or methyl, preferably hydrogen, m represents a whole number from 3 to 8, preferably 4, 5 or 6 and p represents 1, 2 or 3, preferably 1. The invention also relates to the utilization of said systems in the production of therapeutic agents for topical and transdermal applications, especially for dermatological and cosmetic applications or systemic drugs.



(57) Zusammenfassung

Transportsystemkonjugat als transmembranäres Transportsystem, welches aus mindestens einer pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksamen Verbindung besteht, und diese Verbindung derart modifiziert wurde, dass sie mindestens einen Substituenten der Formel (I)  $-Y-(NH-C_6H_4-NH)-C(O)-R$  und mindestens einen an Y gebundenen Substituenten der Formel (II) und/oder (III), aufweist, worin Y einen Rest einer Aminosäure mit ursprünglich mindestens 3 reaktiven Gruppen oder einen Rest von 2 oder 3 aneinander gebundenen Aminosäuren mit ursprünglich mindestens 3 reaktiven Gruppen, jeweils ausgewählt aus Amino  $(-NH_2)$  und/oder Carboxyl  $[-C(O)OH]$ , oder einen dreiwertigen Rest eines Trisamins mit 2-8 C-Atomen,  $C_6H_4-NH-CH_2CH_2CH_2-$  oder  $-CH_2CH_2-$ , vorzugsweise  $-CH_2CH_2-$ , r Null oder eins, vorzugsweise 1, R-C(O) den Rest einer gesättigten, einfach oder mehrfach ungesättigten, gegebenenfalls substituierten,  $(C_4-C_{24})$ -Fettsäure, R<sub>1</sub> Wasserstoff oder Alkyl mit 1, 2, 3 oder 4 C-Atomen, vorzugsweise Wasserstoff oder Methyl, vorzugsweise Wasserstoff, m eine ganze Zahl von 3 bis 8, vorzugsweise 4, 5 oder 6, p 1, 2 oder 3, und vorzugsweise 1, bedeuten, Verwendung solcher Systeme zur Herstellung von Heilmitteln für topische und transdermale Anwendung, insbesondere in der Dermatologie, Kosmetik oder für systemische Pharmaka.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                      |    |  |    |                                   |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                              | LS | Lesotho  | SI | Slowenien                         |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                             | LT | Litauen  | SK | Slowakei                          |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                           | LU | Luxemburg  | SN | Senegal                           |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                                | LV | Lettland   | SZ | Swasiland                         |
| AZ | Aserbaidshan                 | GB | Vereinigtes Königreich               | MC | Monaco   | TD | Tschad                            |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                             | MD | Republik Moldau                                    | TG | Togo                              |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                                | MG | Madagaskar   | TJ | Tadschikistan                     |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                               | MK | Die ehemalige jugoslawische<br>Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                      |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                         |    |  | TR | Türkei                            |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                               | ML | Mali   | TT | Trinidad und Tobago               |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                               | MN | Mongolei   | UA | Ukraine                           |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                               | MR | Mauretanien  | UG | Uganda                            |
| BY | Belarus                      | IS | Island                               | MW | Malawi   | US | Vereinigte Staaten von<br>Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                              | MX | Mexiko   |    |                                   |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                                | NE | Niger  | UZ | Usbekistan                        |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                                | NL | Niederlande  | VN | Vietnam                           |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                          | NO | Norwegen   | YU | Jugoslawien                       |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik<br>Korea | NZ | Neuseeland   | ZW | Zimbabwe                          |
| CM | Kamerun                      |    |                                      | PL | Polen  |    |                                   |
| CN | China                        | KR | Republik Korea                       | PT | Portugal   |    |                                   |
| CU | Kuba                         | KZ | Kasachstan                           | RO | Rumänien   |    |                                   |
| CZ | Tschechische Republik        | LC | St. Lucia                            | RU | Russische Föderation                               |    |                                   |
| DE | Deutschland                  | LI | Liechtenstein                        | SD | Sudan  |    |                                   |
| DK | Dänemark                     | LK | Sri Lanka                            | SE | Schweden   |    |                                   |
| EE | Estland                      | LR | Liberia                              | SG | Singapur   |    |                                   |

Transportsystemkonjugate

Die vorliegende Erfindung betrifft Transportsystemkonjugate als transmembranäre Transportsysteme für topische und transdermale Anwendungen, insbesondere in der Dermatologie und Kosmetik sowie für systemisch wirkende pharmazeutische Wirkstoffe. Das erfindungsgemässe Transportsystem kann für peptidische Wirkstoffe sowie auch für nicht-peptidische Wirkstoffe, wie z.B. Vitamine oder Hormone oder Antibiotika angewendet werden. Die Anwendungsgebiete für die erfindungsgemässe topische und transdermale Verwendung sind zahlreich und betreffen beispielsweise den Transport von Wirkstoffen in und durch die Haut zur Heilung oder zum Schutz der Haut, wie dies im weiteren beschrieben ist.

Der Transport von pharmazeutisch und/oder kosmetisch nutzbaren Wirkstoffen, wie beispielsweise Polypeptide, durch eine Zellmembran zum intrazellulären Wirkort in ausreichender Konzentration ist ein kritischer Faktor bei der Entwicklung einer topisch oder transdermal wirksamen Applikation. So sind beispielsweise die meisten Polypeptide polare und grosse Moleküle, welche schlecht resorbierbar sind, wenn sie oral oder parental verabreicht werden. Einen Ausweg stellt die transdermale Administration dar. Vorteilhaft ist dabei, dass die Haut nur wenige proteolytische Enzyme besitzt, welche das Polypeptid hydrolysieren können. Die zu überwindenden Hürden bei der transdermalen Applikation bilden die natürliche Lipidbarriere der äussersten Hautschicht, der Hornschicht, und für intrazellulär aktive Stoffe zusätzlich die Zellmembranen. Da eine Lipophilie benötigt wird, um lipophile Membranbarrieren zu überwinden, können die Transporteigenschaften von Polypeptiden durch eine lipophile Modifikation erhöht werden. Das Ziel wird meist aber nur in ungenügender Masse erreicht.

Aus J. Med. Chem. 1992, (35) Seiten 118-123, Pharmaceutical Research 1989, (6), Seiten 171-170, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 1999 (48) Seiten 21-26

ist bekannt, dass kurze Peptide, welche mit Fettsäureresten konjugiert sind, eine erhöhte Lipophilie und enzymatische Abbauresistenz aufweisen. So macht  $\alpha$ -Melanotropin, welches mit Decansäure oder Hexadecansäure konjugiert ist, in einem Eidechsen-Haut-Modell eine gewisse Dunkelfärbung der Haut. Die Aktivität der Konjugate ist aber insgesamt ungenügend und das Prinzip der Konjugate insbesondere nicht breiter anwendbar.

Es wurde nun gefunden, dass es überraschenderweise gelingt, pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Substanzen als Transportsystemkonjugate bzw. als transmembranäre Transportsysteme für topische und transdermale Anwendungen herzustellen, so dass diese schnell und in ausreichender Konzentration durch die Zellmembran zum intrazellulären Wirkort diffundieren. Die erfindungsgemässen Transportsystemkonjugate sind auf Fibroblasten, Keratinozyten, Melanozyten und Langerhans-Zellen anwendbar und sind biologisch weniger leicht abbaubar. Sie können deshalb ihre Funktion in der Zelle länger ausüben.

Fibroblasten sind im Bindegewebe, unter anderem auch in der Dermis lokalisiert. Während der Wundheilung bilden die zu Myofibroblasten umdifferenzierten Fibroblasten Bündel von Actinmikrofilamenten, genannt Stressfibers, welche  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SM-Actin) enthalten. Diese Fibers sind auch mit kontraktilen Proteinen und Cytoskelettproteinen vernetzt. In der Kontraktion von Wunden spielen daher diese Stressfibers eine grosse Rolle. Glatte Muskelzellen besitzen die gleichen Stressfibers wie die Myofibroblasten und dienen daher als Modellsystem.

In Journal of Cell Biology, 1995, 130, 887-895 (Gabbiani et al.) wird vorgeschlagen, dass in der Zelle ein bisher nicht identifiziertes Protein am Einbau von  $\alpha$ SM-Actin in die Stressfibers beteiligt ist. Dabei wird  $\alpha$ SM-Actin selbst

polymerisiert und in die Stressfibers eingebaut. Wird ein kurzes, isoliertes Fragment dieses  $\alpha$ SM-Actin Polypeptids mit der spezifischen Sequenz Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-NH<sub>2</sub> im Überschuss in diese Zellen mikroinjiziert, so hemmt dies in vivo die Polymerisation von  $\alpha$ -smooth muscle actin. Es ist daher möglich, dass dieses Tetrapeptid den vollständigen Aufbau der Stressfibers hemmt und dadurch die unerwünschte Funktion der Kontraktion in der Wundheilung verhindert.

In der vorliegenden Erfindung kann bei den Fibroblasten gezeigt werden, dass dieses Tetrapeptid in der Form des erfindungsgemässen Transportsystemkonjugats ohne Mikroinjektion in die Zelle gebracht werden kann und derart die Polymerisation von  $\alpha$ SM-Actin genauso effektiv blockiert wie das mikroinjizierte Tetrapeptid. Letzteres kann die Zellmembran selbst nicht penetrieren, wie in einem Kontroll-experiment gezeigt wurde. Insbesondere kann gezeigt werden, dass der allgemein bekannte Ansatz, lipophile Fettsäurekonjugate (Hexadecanoyl oder Octanoyl oder andere) des Tetrapeptids zu verwenden hier nicht funktioniert. Für das vorliegende Tetrapeptid wurde im Experiment gezeigt, dass die Aufnahme des Tetrapeptids in die Zelle überraschenderweise möglich ist, wenn dieses als transmembranäres Transportsystem vorliegt bzw. mit einem erfindungsgemässen Transporter verbunden ist, welcher an das carboxyterminale Ende des Tetrapeptids über die Aminosäure Asp verknüpft ist. Der Transporter besteht im vorliegenden Experiment aus der Aminosäure Lysin, bei welcher die Seitenkette von Lysin in der  $\epsilon$ -Position über eine Amidbindung mit D,L-6,8-Dithiooctansäure verknüpft ist. Das Tetrapeptid, verknüpft mit dem genannten Transportermolekül, weist eine signifikant höhere Verfügbarkeit in der Zelle auf, verglichen mit dem nicht modifizierten Tetrapeptid. Die Verfügbarkeit kann weiter merklich erhöht werden, wenn das carboxyterminalen Ende des Tetrapeptids zusätzlich durch eine 1,2-Ethylen-diamid-Verknüpfung mit einer Fettsäure, beispielsweise mit Octansäure, konjugiert wird. Vorteilhaft ist dabei, dass

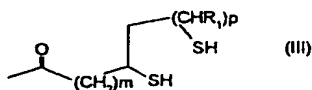
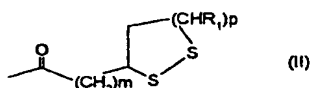
durch eine Fettsäure die unerwünschte enzymatische Abbaubarkeit des Wirkstoffes heruntergesetzt wird, ohne die Wirksamkeit des Wirkstoffes zu beeinträchtigen. Keratinozyten bauen im wesentlichen die äusseren Hautschichten, die Epidermis und Stratum Corneum (Hornschicht) auf. Der Zustand der Epidermis ist deshalb vor allem von den Wachstumseigenschaften und dem Differenzierungsgrad der Keratinozyten abhängig. Der Transport von nutzbaren, pharmakologisch aktiven Verbindungen, wie beispielsweise Peptide, durch die Zellmembran von Keratinozyten ist für dermatologische und kosmetische Anwendungen von grossem Interesse.

In der vorliegenden Erfindung kann gezeigt werden, dass das Peptid Ac-Leu-Gly-Asp konjugiert mit dem Transporter H-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanamid)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-octanoylamid die Zellmembran penetrieren kann. 5-(Biotinamido)pentylamin (Pierce Inc, Rockport, IL, USA) dient dabei als Fluoreszenzmarker und ist als Amid am Asp befestigt.

Melanozyten sind in der Basal-Zellschicht der Epidermis lokalisiert und verantwortlich für die Pigmentierung (Melanine) der Haut. Die Tyrosinase ist ein in Melanozyten exprimiertes Enzym, das in der Biosynthese der Melanine eine Schlüsselrolle spielt. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Melanin-bildenden Enzyms (Tyrosinase) wesentlich von Phosphorylierungen an Serinresten der cytoplasmatischen Domäne des Enzymes abhängig ist (Park et al, 1993, JBC 268; 11742-11749/Park et al. 1995, J. Invest. Dermatol. 104:585 Abstr. 186). Darauf basierend wurde beschrieben, dass ein Peptid, genannt Tyrosinase-Mimicking Peptid (TMP), mit der Sequenz Glu-Asp-Tyr-His-Ser-Leu-Tyr-Asn-Ser-His-Leu in der Zelle die Phosphorylierung der Tyrosinase verhindert und so die Aktivität der Tyrosinase und das Ausmass der Pigmentierung der Haut reduziert (PCT WO 97/35998). Wird das Peptid TMP mit dem Transporter H-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanoylamid)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-

octanoylamid verknüpft, so dringt diese als trans-membranäres Transportsystem erfindungsgemäss ausgebildete Form erheblich besser in die Zellen ein als freies TMP. Da TMP die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der Tyrosinase kompetitiv hemmt, kann das Einschleusen von Transporter-gebundenem TMP in die Zellen indirekt durch die Hemmung der Melaninbildung gemessen werden.

Die vorliegende Erfindung ist in den Patentansprüchen definiert. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Transportsystemkonjugat als transmembranäres Transportsystem, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass dieses Transportsystemkonjugat aus mindestens einer pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksamen Verbindung besteht, und diese Verbindung derart modifiziert wurde, dass sie mindestens einen Substituenten der Formel (I) und mindestens einen an Y gebundenen Substituenten der Formel (II) und/oder (III):



aufweist, worin

Y einen Rest einer Aminosäure mit ursprünglich mindestens 3 reaktiven Gruppen oder einen Rest von 2 oder 3 aneinander gebundenen Aminosäuren mit ursprünglich mindestens 3 reaktiven Gruppen, jeweils ausgewählt aus Amino (-NH<sub>2</sub>) und/oder Carboxyl [-C(O)OH], oder einen dreiwertigen Rest eines Trisamins mit 2-8 C-Atomen,  
 $C_nH_{2n}$  -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- oder -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, vorzugsweise -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,

- r Null, 1 oder 2, vorzugsweise Null oder 1,  
vorzugsweise 1
- R-C(O) den Rest einer gesättigten, einfach oder mehrfach ungesättigten, gegebenenfalls substituierten, (C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>)-  
Fettsäure,
- R<sub>1</sub> Wasserstoff oder Alkyl mit 1, 2, 3 oder 4 C-Atomen,  
vorzugsweise Wasserstoff oder Methyl, vorzugsweise  
Wasserstoff,
- m eine ganze Zahl von 3 bis 8, vorzugsweise 4, 5 oder 6,
- p 1, 2 oder 3, und vorzugsweise 1,  
bedeuten.

Die vorliegende Erfindung betrifft im weiteren Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemässen Transportsystemkonjugate, sowie die Verwendung dieser Transportsystemkonjugate für topische und transdermale Anwendungen in der Dermatologie, Kosmetik oder für systemisch wirkende Pharmaka. Die vorliegende Erfindung betrifft im weiteren Heilmittel, welche ein erfindungsgemässes Transportsystemkonjugat enthalten, sowie deren topische und transdermale Anwendung in der Dermatologie, Kosmetik oder für systemisch wirkende Pharmaka.

Bedeutet Y einen Rest einer Aminosäure mit ursprünglich mindestens 3 reaktiven Gruppen, so bedeutet Y vorzugsweise einen Rest einer Aminosäure mit ursprünglich mindestens einer Carboxylgruppe [-C(O)OH] und mindestens zwei Aminogruppen (-NH<sub>2</sub>), wie beispielsweise Lysin (Lys), oder einen Rest einer Aminosäure mit ursprünglich mindestens zwei Carboxylgruppen und mindestens einer Aminogruppe, wie beispielsweise Asparaginsäure (Asp) oder Glutaminsäure (Glu), Ornithin, D,L α,β-Diaminopropionylsäure, D,L-α,γ butyrylaminosäure, Citrullin, Homocitrullin, D,L-2-Amino-Hexandisäure, D,L-2-Aminoheptandisäure, 2-Amino-2 Octandisäure.

Y als Rest von 2 oder 3 aneinander gebundenen Aminosäuren mit ursprünglich mindestens 3 reaktiven Gruppen, wird bei-



spielsweise durch den Rest von zwei aneinandergebundenen Moleküle Lys, Gly (Lys.Gly) oder aneinandergebundenes und Alanin und L-2-Amino-Adipinsäure, (L-2-Amino-adipinsäure.Ala) dargestellt.

Y bedeutet vorzugsweise den Rest von Lysin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure, Ornithin, L-2,3-Diaminopropionsäure, L- $\alpha,\gamma$  butyrylaminosäure, Citrullin, Homocitrullin, L-2-Amino-adipinsäure, L-2-Amino-heptandisäure, L-2-Amino-Octandisäure oder von Tris(2-aminoethyl)amin und vorzugsweise den Rest von Lysin. Dabei können die D.L-Form, D oder L Form dieser Aminosäuren verwendet werden,

Bedeutet  $r = 1$ , so ist im Rest der Formel (I) der Rest  $-C(O)-R$  über die Übergangsgruppe (Linker)  $-(NH-C_nH_{2n}-NH)-$  an die Carbonylgruppe von Y gebunden. Bedeutet  $r = \text{Null}$ , so ist im Rest der Formel (I) der Rest  $-C(O)-R$  direkt, d.h. ohne Linker, an eine NH-Gruppe von Y gebunden. Vorzugsweise bedeutet  $r = 1$ , wobei dann der Rest der Formel (I) vorzugsweise der Formel  $-Y-NH-CH_2CH_2-NH-C(O)-R$  entspricht.

$R-C(O)-$  als Rest einer gesättigten, einfach oder mehrfach ungesättigten, gegebenenfalls substituierten,  $(C_4-C_{24})$ -Fettsäure, bedeutet als Rest einer gesättigte Säure beispielsweise den entsprechenden Carbonylrest der Buttersäure, Valeriansäure, Capronsäure, Heptansäure, Caprylsäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure oder Arachinsäure, als Rest einer ungesättigte Säure beispielsweise den entsprechenden Carbonylrest der  $\Delta^9$ -Dodecylensäure, Oleinsäure, Linolsäure, Arachidonsäure, und als Rest einer substituierten olefinischen Fettsäure beispielsweise den entsprechenden Carbonyl der Ricinoleinsäure. Bevorzugt bedeutet  $R-C(O)$  den Rest einer gesättigten oder ungesättigten Fettsäure mit 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18 C-Atomen, vorzugsweise den entsprechenden Rest einer gesättigten Fettsäure, vorzugsweise den entsprechenden Rest der Caprylsäure  $[CH_3-(CH_2)_6-C(O)-]$ ,

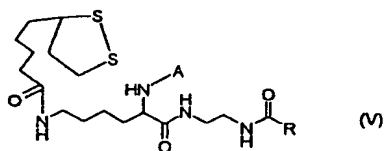
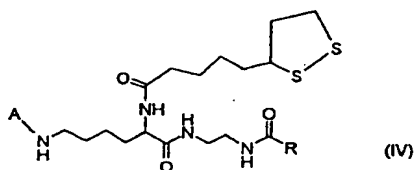
Laurinsäure  $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{C}(\text{O})-]$ , Myristinsäure  $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}(\text{O})-]$ , Palmitinsäure  $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(\text{O})-]$  oder Stearinsäure  $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{C}(\text{O})-]$ .

Der Rest der Formel (II) bedeutet vorzugsweise D,L-6,8-Dithiooctancarbonyl. Dieser Rest kann direkt an eine NH-Gruppe von Y, oder über eine Übergangsgruppe (Linker), z.B. über die Gruppe  $-(\text{NH}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{NH})-$ , welche vorzugsweise  $-(\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH})-$  bedeutet, an eine Carbonylgruppe von Y gebunden sein. Vorzugsweise ist der Rest der Formel (II), vorzugsweise als D,L-6,8-Dithiooctanamidrest, direkt am aminoterminalen Ende der aminoterminalen Seitenkette und/oder an den NH-Rest in  $\alpha$ -Stellung von Y mittels einer Amidbindung befestigt.

Im Rest der Verbindung der Formel (III) bedeutet m vorzugsweise 4 und p vorzugsweise 1. Der Rest der Formel (III) kann in analoger Weise, wie für den Rest der Formel (II) beschrieben, an Y gebunden sein. Schutzgruppen der Thiolfunktion sind vorzugsweise Trityl, t-Butyl, Benzyl, Ethyl, Methyl, Acetamidomethyl, 4-Methoxybenzyl, 4-Methylbenzyl, Diphenylmethyl.

Die im erfindungsgemässen Transportsystemkonjugat enthaltene pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Verbindung kann direkt an eine NH-Gruppe oder an eine Carbonylgruppe von Y, gegebenenfalls über eine geeignete Übergangsgruppe, wie z.B.  $-(\text{NH}-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{NH})-$ , gebunden sein. Dies hängt davon ab, ob die pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Verbindung über eine darin enthaltene Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino-, oder SH-gruppe oder andere geeignete Gruppe an Y gebunden werden soll. Vorzugsweise ist die pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Verbindung direkt oder über eine geeignete Zwischengruppe an eine NH-Gruppe von Y gebunden, vorzugsweise direkt am aminoterminalen Ende und/oder an den NH-Rest in  $\alpha$ -Stellung von Y, befestigt.

Erfindungsgemässe Transportsystemkonjugate als transmembranaere Transportsysteme entsprechen vorzugsweise der Formel (IV) oder der Formel (V):



worin A den Rest der erfindungsgemäss modifizierten pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksamen Verbindung bedeutet und R die oben angegebenen Bedeutung hat.

Das erfindungsgemäße Transportsystem kann für pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Verbindungen, beispielsweise für peptidische Wirkstoffe sowie auch für nicht-peptidische Wirkstoffe, wie z.B. Vitamine, Hormone oder Antibiotika angewendet werden. Bevorzugt ist Verwendung für peptidische Wirkstoffe, d.h. für Peptide und Polypeptidverbindung.

Als peptidischer Wirkstoff bedeutet "Peptid" eine Aminosäure, vorzugsweise eine  $\alpha$ -Aminosäure. "Polypeptid" als peptidischer Wirkstoff bedeutet ein Polypeptid mit vorzugsweise 2-20 Aminosäureeinheiten, vorzugsweise Glu-Glu-

Glu-Asp, Glu-Glu-Glu-Asp-Lys, Glu-Glu-Glu-Asp-Ser-Thr-Ala-Leu-Val-Cys, Ala-Glu-Glu-Asp, Glu-Glu-Glu-Glu, Ala-Glu-Glu-Glu, Glu-Glu-Glu-Asp-Ala-Thr-Ala-Leu-Val-Cys, Glu-Glu-Glu-Asp-Leu-Thr-Ala-Leu-Val-Cys, Leu-Gly-Asp. Bei den Aminosäuren kann es sich sowohl um L-Aminosäuren als auch um D-Aminosäuren, sowie auch um entsprechende Salze, wie beispielsweise mit TFA, oder Acetate oder Propionate, oder Salze gebildet mit  $H_3PO_4$ , HBr handeln.

Verwendet man im erfindungsgemässen Transportsysteme als Wirkstoff ein modifiziertes Peptid oder Polypeptid und/oder Verbindungen, welche freie Gruppen, wie beispielsweise -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub> oder -SH<sub>2</sub> aufweisen, so können diese Verbindungen mit Schutzgruppen versehen sein, welche an diesen allenfalls vorhandenen reaktiven Gruppen befestigt sind. Solche Schutzgruppen sind vorzugsweise Acetyl, Boc, tert.-Butyl, substituierte Benzylester, substituierte Methyl-ester, 2-substituierte Ethylester, gegebenenfalls substituiertes (C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>)Alkylcarbonyl oder einfach oder mehrfach ungesättigtes gegebenenfalls substituiertes (C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>)-Alkenylcarbonyl, substituierte Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Isopropylcarbamate. Als Schutz- und Kontrollgruppe kann auch ein Fluoreszenzmarker, vorzugsweise Biotin, verwendet werden, wobei - bei Verwendung von Peptiden und Polypeptiden - die niedermolekulare Schutzgruppe, die (C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>)-Alkylcarbonsäure, die (C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>)Alkenylcarbonsäure oder der Fluoreszenzmarker vorzugsweise direkt am aminoterminalen Ende oder über den Linker -Y- am carbonylterminierten Ende des Peptids oder Polypeptids befestigt ist.

Alle an sich bekannten Peptide, insbesondere Oligopeptide, vorzugsweise solche mit einem mittleren Molekulargewicht von bis zu 20kDa (mittleres Molekulargewicht bis zu 20'000), können erfindungsgemäss verwendet werden. Bevorzugt sind Polypeptide mit den Sequenzen Glu-Glu-Glu-Asp, Glu-Glu-Glu-Asp-Lys, Leu-Gly-Asp, Glu-Asp-Tyr-His-Ser-Leu-Tyr-Asn-Ser-His-Leu, sowie analoge Sequenzen.

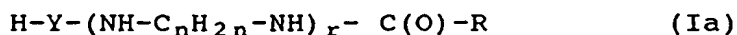
Für die erfindungsgemässe Verwendung sind auch Vitamine, Hormone und Antibiotika geeignet. Bevorzugt verwendete Vitamine sind Vitamin A, Vitamin B1, Vitamin B2, Vitamin B6, Vitamin C, Vitamin D, Vitamin E und Vitamin K. Die Transportkonjugate der Formel 4 oder 5 werden bevorzugt über eine Uebergangsgruppe als Amid auf der Konjugatseite mit z.B. Succinyl oder einer anderen Dicarbonsäure und als Ester mit der Hydroxylgruppe von Vitaminen und Hormonen verbunden. Im Falle von Hormonen und Vitaminen mit Carboxylgruppe wird der Transporter direkt als Amid geknüpft.

Bevorzugte Hormone sind Peptid-Hormone, insbesondere Adiuretin, Oxytocin, Melanozyten-stimulierendes Hormon, Calcitonon sowie Nichtpeptidhormone, insbesondere Glucocorticoide, Androgene und Östrogene.

Die Oligopeptidderivate können nach den im folgenden beschriebenen an sich bekannten Verfahren (allgemeinen Vorschriften von M. Bodanszky "The Practice of Peptide Synthesis" Springer Verlag, 2<sup>nd</sup> Edition 1994) hergestellt werden. Entsprechend wird die Aminosäure, beispielsweise Asp, in einer Festphasensynthese am carboxyterminalen Ende an ein Harz angeknüpft, wobei deren Aminogruppe durch eine Schutzgruppe, z.B. durch die Fmoc-Schutzgruppe, geschützt wird. Die Seitenkette wird z.B. mit Boc oder t-Butyl geschützt. Die Schutzgruppen werden nach Bedarf selektiv abgespalten, um die weiteren Aminosäurenderivate mit den in der Peptidsynthese üblichen Reagentien anzuknüpfen bis die gewünschte Kettenlänge vollständig aufgebaut ist. Das Peptid wird dann am carboxyterminalen Ende vom Harz abgespalten und dieses carboxylterminale Ende mit dem aminoterminalen Rest von Lys, welches am carboxyterminalen Ende durch eine 1,2-Ethylendiamidverknüpfung mit unterschiedlichen Alkylsäureresten verbunden ist, verknüpft. Die Schutzgruppen werden entfernt und das freie  $\epsilon$ -aminoternale Ende der Seitenkette des Lysin z.B. mit dem N-Hydroxysuccinimid-ester von D,L-6,8-Dithiooctanamid umgesetzt.

Im Prinzip stellt man das erfindungsgemässe Transporter-systemkonjugat so her, dass man eine an sich bekannte pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Verbindung, vorzugsweise eine Aminosäure mit beliebiger aminoterminaler Seitenkette und einem carbonylterminierten Ende, über eine Amidstruktur mit einer geeigneten dem Rest -Y- entsprechenden Ausgangsverbindung, in an sich bekannter Weise an deren aminoterminalen Ende und/oder carboxyterminalen Ende direkt oder über einen Linker verknüpft, wobei man gegebenenfalls vorher oder nachher eine oder mehrere Schutzgruppen einfügt, und man anschliessend das erhaltene Zwischenprodukt in an sich bekannter Weise mit den geeigneten dem Rest -C(O)R und den Formeln (II) und/oder (III) entsprechenden Ausgangsverbindungen zum Transport-systemkonjugat umsetzt.

Man kann das erfindungsgemässe Transportsystemkonjugat auch in anderer beliebiger Reihenfolge zusammenfügen. So kann man zuerst die Verbindung der Formel (Ia):



herstellen, welche mit den Resten der Formeln (II) und/oder (III) sowie der pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksamen Verbindung noch nicht verknüpft ist, und anschliessend die Verbindung der Formel (Ia) mit den geeigneten Ausgangsverbindungen der Reste der Formeln (II) und/oder (III) sowie der pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksamen Verbindung in an sich bekannter Weise umsetzen.

Die beschriebenen erfindungsgemässen Transportsystemkonjugate dienen vorzugsweise dazu, ein Peptid/Oligopeptid bestehend aus Aminosäuren mit der Konfiguration D- oder L- oder nicht-natürlichen Aminosäuren, z.B. Peptoide, d.h. peptidähnliche Verbindungen, mit beliebiger Sequenz gegebenenfalls mit in der Peptidchemie üblichen Schutzgruppen, oder ein Protein bis zu einer Grösse von 20kDa

(mittleres Molekulargewicht 20'000) gegebenenfalls durch die Zellmembran ins Innere der Zelle zu transportieren. Das entsprechende erfindungsgemässe Transportsystem ist auf Fibroblasten, Keratinozyten, Melanozyten und Langerhans-Zellen anwendbar. Solche Verbindungen sind biologisch weniger leicht abbaubar und können deshalb ihre Funktion in der Zelle länger ausüben.

Das erfindungsgemässe Transportsystem kann auch mit Oligonucleotiden-Analoga konjugiert werden, um diese Moleküle ins Zellinnere zu transportieren. Solche Oligonukleotidanaloga können gezielt die Expression ausgewählter Gene hemmen (durch Hybridisierung der mRNA wird die Proteinsynthese verhindert). Anstelle von Oligonukleotiden können auch strukturell ähnliche Derivate verwendet werden, die weniger schnell abgebaut werden. Bei den Transportsystemgebundenen Peptiden handelt es sich um Substanzen, die im Innern der oben erwähnten Zellen eine biologische Funktion ausüben. Darunter werden Enzyminhibitoren (z.B. Proteaseinhibitoren), Rezeptor bindende Peptide, die als Agonisten oder Antagonisten wirken, verstanden. Es können auch Peptide oder peptidähnliche Verbindungen eingesetzt werden, die in der Zelle die Präsenz eines anderen Moleküles vortäuschen können. Ein Peptid, das eine Phosphorylierungsstelle einer Proteinkinase imitiert kann eingesetzt werden, um intrazelluläre Signalkaskaden zu hemmen. Als Anwendung kommt z.B. die Modulation des Zellwachstums (Verhinderung der Hyperproliferation von Keratinozyten zur Behandlung von Psoriasis) in Frage. Ebenso können Substanzen, die das Wachstum und/oder die Differenzierung der Keratinozyten regulieren, für kosmetische Zwecke oder zur Behandlung von Psoriasis erfindungsgemäss eingesetzt werden.

Gemäss der vorliegenden Erfindung können auch Substanzen zur Anwendung kommen, die zur Modulation der Melaninsynthese in der Haut (im engeren Sinne in den Melanozyten) dienen. Dabei können Substanzen eingesetzt werden, welche

die Melaninbildung hemmen oder welche die Melaninbildung beschleunigen.

Im weiteren kann das erfindungsgemässe Transportsystem auch mit nichtpeptitischen Wirkstoffen mit maximalen Molekulargewicht bis 700 (siebenhundert) konjugiert werden, z.B. mit Vitaminen, Hormonen, Antibiotika und ähnlichen Substanzen, wobei die erfindungsgemässen Transportsysteme direkt oder über geeignete Linker an das entsprechende Molekül gebunden sind.

Die hierin beschriebenen und aus den obigen Beispielen hervorgehenden, Wirkstoffe enthaltenden, Transportsystemkonjugate sind für topische und transdermale Anwendungen in der Dermatologie, Kosmetik oder für systemisch wirkende Pharmaka anwendbar. In diesem Sinne betrifft die vorliegende Erfindung Heilmittel, welche ein erfindungsgemässes Transportsystem enthalten, insbesondere für deren topische und transdermale Anwendung. Ausgewählte Anwendungsgebiete für die erfindungsgemässe topische und transdermale Verwendung sind beispielsweise Wirkstoffe zur Bekämpfung von Hautalterung, Entzündungen, Cellulitis, Psoriasis, Antimelanoma, Arthritis, Akne, Neurodermitis, Ekzeme, Paradontitis oder Verbrennungen, als Radikalfänger, Hautbräuner oder Hautbleicher, zur Haarwuchsförderung oder Haarwuchshemmung, als Immunstimulatoren, zum Transport von Regenerierungswirkstoffen oder Antibiotika oder in der Verwendung auf dem Gebiet der Wundheilung. Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Benutzte Abkürzungen im Text und in den Beispielen 1-8:

|        |                  |
|--------|------------------|
| Gly:   | Glycin           |
| L-Leu: | L-Leucin         |
| L-Asp: | L-Asparaginsäure |
| L-Glu: | L-Glutaminsäure  |
| L-Lys: | L-Lysin          |
| Ac:    | Acetyl           |



AcOH: Essigsäure  
Boc: tert-Butoxycarbonyl  
DCH: N,N-Dicyclohexylharnstoff  
DIC: Diisopropylcarbodiimid  
DMF: N,N-Dimethylformamid  
NHS: N-Hydroxysuccinimid  
HCl: Hydrochlorid  
NMM: N-Methylmorpholin  
TBTU: O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N',-  
tetramethyluronium-tetrafluoroborat  
TFA: Trifluoressigsäure  
RT: Raumtemperatur  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
FCS: Foetal Calf Serum  
PBS: Phosphate-buffered saline  
DME: 1,2-Dimethoxyethan  
Biotin: Vitamin H  
Ig: Immunglobulin

Beispiel 1 (Penetration von carrierkonjugierten Peptiden im Zelltyp Hautfibroblasten [Glatte Muskelzellen])

Benutzte Untersuchungsmethode:

Smooth muscle cells werden aus der Thorax-Aorta von 6 Wochen alten Wistarratten durch enzymatische Spaltung isoliert. 10000 Zellen werden auf 60 mm Petrischalen aufgebracht und 5-6h in DME und 10% Fetal Calf-Serum wachsen gelassen. Die Zellen werden mit den Peptiden ca. 1 Stunde im Inkubator inkubiert, anschliessend zweimal mit PBS-Puffer (0.5 mmol  $\text{CaCl}_2$ , 3 mmol  $\text{MgCl}_2$ ) gewaschen, dann mit 3% Paraformaldehyd für 10 min fixiert und permeabilisiert mit 0.1% Triton X 100 in PBS-Puffer für 1 Minute Doppel-Immunfluoreszenzfärbung für  $\alpha$ -SM-Actin und Gesamt-Actin mit Anti- $\alpha$ -SM 1 und Kaninchen-polyklonal anti Actin-Antikörper, gefolgt von Tetramethylrhodamin B isothiocyanat oder Fluoreszenzisothiocyanat konjugierten Schaf-Anti-Maus IgG

und Fluoreszenzisothiocyanat konjugierten Schaf-Anti-Kaninchen IgG. Man wäscht mit PBS-Puffer und fixiert die Präparationen in Polyvinylalkohol-Puffer. Fotografische Aufnahmen werden mit einem Zeiss Axiophot Photomikroskop durchgeführt mit Filter für Fluoreszein oder Rhodamin:

Die Figuren 1-6 zeigen die Immunfluoreszenz-Photographien der Hemmung der Polymerisation 1 Stunde nach Behandlung der Zellkulturen mit den Substanzen und der Konzentration der Zellkulturlösung von 1 mg/ ml:

Figur 1: Kontrollexperiment mit Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-NH<sub>2</sub>  
Linkes Bild: Starke Fluoreszeinfärbung; rechtes Bild: starke Rhodaminfärbung der Smooth muscle  $\alpha$ -Actinpolymere. Die Polymerisation der Smooth- $\alpha$ -Actin-Filamente ist vollständig entwickelt. Keine Penetration des Peptids in die Zelle.

Figur 2: Tetrapeptid konjugiert mit Transporter:  
Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-hexadecanoylamid.  
Linkes Bild: starke Fluoreszeinfärbung; rechtes Bild: starke Rhodaminfärbung der Smooth muscle  $\alpha$ -Actinpolymere. Die Polymerisation der Smooth- $\alpha$ -Actin-Filamente ist vollständig entwickelt. Keine Penetration des Peptids in die Zelle.

Figur 3: Tetrapeptid konjugiert mit Transporter:  
Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-octanoylamid.  
Linkes Bild: starke Fluoreszeinfärbung; rechtes Bild: starke Rhodaminfärbung der Smooth muscle  $\alpha$ -Actinpolymere. Die Polymerisation der Smooth- $\alpha$ -Actin-Filamente ist vollständig entwickelt. Keine Penetration des Peptids in die Zelle.

Figur 4: Tetrapeptid konjugiert mit Transporter:  
Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys( $\epsilon$ -D, L-6,8-Dithiooctanoylamid)-NH<sub>2</sub>

- 17 -

Linkes Bild: teilweise Fluoreszeinfärbung; rechtes Bild: teilweise Rhodaminfärbung der Smooth muscle  $\alpha$ -Actinpolymere. Die Polymerisation der Smooth- $\alpha$ -Actin-Filamente ist teilweise entwickelt. Penetration des Peptids in die Zelle.

Figur 5: Tetrapeptid konjugiert mit Transporter:

Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanoylamid)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-octanolyamid.

Linkes Bild: geringe Fluoreszeinfärbung; rechtes Bild: geringe Rhodaminfärbung der Smooth muscle  $\alpha$ -Actinpolymere: Die Polymerisation der Smooth muscle- $\alpha$ -Actin-Filamente ist sehr schwach entwickelt: Beste Penetration des Peptids in die Zelle.

Figur 6: Tetrapeptid konjugiert mit Transporter: Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanoylamid)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-hexadecanoylamid. Linkes Bild: Geringe Fluoreszeinfärbung, rechtes Bild: Geringe Rhodaminfärbung der Smooth muscle  $\alpha$ -Actinpolymere: Die Polymerisation der Smooth- $\alpha$ -Actin-Filamente ist sehr schwach entwickelt: Gute Penetration des Peptids in die Zelle.

Eine qualitative Dosis-Wirkungsbeziehung für Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanoylamid)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-octanoylamid wurde durchgeführt für c = 0.5 mg, 1 mg, 2 mg pro ml Zellkulturlösung.

Beispiel 2 (Penetration von carrierkonjugierten Peptiden im Zelltyp Keratinozyten)

Benutze Untersuchungsmethoden: Ca.  $5 \times 10^5$  HaCaT-Zellen (ein Geschenk von Dr.N.E. Fusenig, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) werden aus einer konfluenten Kultur (DMEM + 5 % FCS) in 60mm Kulturschalen ausgesät und etwa 12 Stunden wachsen gelassen. Man inkubiert während 4 Stun-

den die Zellkulturen mit 25  $\mu$ M Ac-Leu-Gly-Asp[NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-CO-Biotin]-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanamid)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-octanoylamid, wäscht (2 x mit DMEM ohne FCS) und fixiert für 5 min die Zellen bei -20°C mit EtOH/Essigsäure (95/5). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird mit Fluorescein markiertem Streptavidin (1000 x verdünnt in PBS+10 % FCS) gebunden. Vor der Mikroskopie wurden die Zellen noch dreimal mit PBS gewaschen und getrocknet. Aufnahmen mit Confocal Scanning Laser Mikroskop (Sarastro 2000, Molecular Dynamics). Exzitation bei 488nm, Emissionsfilter bei 510nm.

Folgende Ansätze wurden gemacht:

- a) HaCaT
- b) HaCaT + NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)-NH-CO-Biotin
- c) HaCaT + Ac-Leu-Gly-Asp[NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-CO-Biotin]-OH
- d) HaCaT + Ac-Leu-Gly-Asp[NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-CO-Biotin]-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanamid)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-octanoylamid

Ansatz d zeigt eine schöne Fluoreszenzfärbung. Im Gegensatz dazu zeigt der Ansatz b) mit Biotin oder mit Ac-Leu-Gly-Asp-OH (Ansatz c) behandelten Zellen keine Fluoreszenzfärbung.

Beispiel 3 (Penetration von carrierkonjugierten Tyrosinase Mimicking Peptide (TMP) im Zelltyp Melanozyten)

Benutzte Untersuchungsmethoden:

Cloudman S91 Melanomazellen (ATCC CCL-53.1) werden bis zur Konfluenz in 24-Loch Kulturschalen in DMEM + 10% FCS kultiviert. Die S91 Zellen (0.5 ml pro Kultur) werden für 5 Tage mit und ohne TMP und mit 15nM  $\alpha$ -MSH inkubiert und anschliessend geerntet. Das TMP/TMP-L wird mindestens 2 Stunden vor dem  $\alpha$ -MSH zugegeben. Für die Melaninbestimmung wird das Medium verworfen und die adherenten Zellen 1x mit PBS

gewaschen. Anschliessend werden die Zellen mit 0.1 ml 0.2 M NaOH lysiert und der Melaniningehalt im Lysat bei 450nm gemessen. Die Kulturen der Versuchsreihe werden doppelt angesetzt, um vom 2. Ansatz die Zellzahl mit dem MTT-Test (Mosmann T. 1983, J. of Immun. Methods, 65, 55-63) zu bestimmen. Die Zellzahl gibt wachstumshemmende Effekte an und der Melaniningehalt wird in Relation zur Zellzahl angegeben ( $OD_{450nm}/10^6$  Zellen).

Folgende Ansätze wurden gemacht:

- a) S91
- b) S91+30nM TMP
- c) S91+30nM TMP-Transporter
- d) S91+30nM Transporter
- e) S91+15nM  $\alpha$ -MSH
- f) S91 +15nM  $\alpha$ -MSH+30nM TMP
- g) S91 +15nM  $\alpha$ -MSH+30nM TMP-Transporter
- h) S91 +15nM  $\alpha$ -MSH+30nM Transporter

TMP-Peptid-Transporter: H-Glu-Asp-Tyr-His-Ser-Leu-Tyr-Asn-Ser-His-Leu-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanamid)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-NH-octanoylamid

Transporter: H-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanamid)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-NH-octanoylamid

Bei den Ansätzen von S91, behandelt mit 30nM freiem TMP (b), sowie S91 mit 30nM Transporter gebundenem TMP (c), oder S91 nur mit freiem Transporter (d) und auch S91 mit 15nM  $\alpha$ -MSH (g) und Transporter gebundenem TMP weichen die gemessenen OD-Werte bei 450nm ( $OD_{450nm}$  ca. 0.2) nicht wesentlich von der negativen Kontrolle (= S91 unbehandelt) (a) ab. Folglich wurde in diesen Ansätzen die Melaninbildung nicht zusätzlich angeregt. Bei den Ansätzen von S91 mit 15nM  $\alpha$ -MSH (e), sowie 15nM  $\alpha$ -MSH und 30nM freiem TMP (f) als auch 15nM  $\alpha$ -MSH mit 30nM freiem Transporter (h) wurde ein erhöhter  $OD_{450nm}$ -Wert (ca. 0.7) gemessen. In

diesen Fällen wurde die Melaninbildung durch  $\alpha$ -MSH angeregt.

Die Verhinderung der durch  $\alpha$ -MSH induzierten Melaninbildung wurde dank dem besser membranpermeablen, Transporter-gebundenem TMP ermöglicht (im Ansatz von S91 mit  $\alpha$ -MSH kombiniert mit Transportergebundenem TMP) (g).

In den folgenden Beispielen 4 bis 8 ist die Herstellung der erfindungsgemässen Oligopeptidderivaten beschrieben. Die Analyse der gemäss den Beispielen erhaltenen Eluate und Produkte wurde mit Proton-NMR, HPLC-Elektrospray-MS.

Beispiel 4 (Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys-( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanoylamid)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>)

4a) Herstellung von Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-OH:

In einem typischen Festphasensyntheseprotokoll wurden durch repetitive Kopplung von 20 g (9.8 mmol, Beladung: 0.49 mmol/g) käuflichem H-Asp-chlorotritylharz mit 14.7 mmol der Aminosäuren Fmoc-Glu(OtBu)-OH (2 x) und Ac-Glu(OtBu)-OH, 14.7 mmol TBTU, 29.7 mmol Collidin und Deblockierung mit 20% Piperidin in DMF (2 x 5 min) das Tetrapeptid aufgebaut, mit 1% TFA in Dichlormethan vom Harz abgespalten und über Sephadex LH20® (MeOH) gereinigt, Ausbeute: 6.02 g (70%).

4b) Herstellung von H-Lys(Boc)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>:

(i) 4.0 g (25.0 mmol) Boc-NH-ethyldiamin und 2.0 g (12.5 mmol) Octanoylchlorid wurden in 20 ml Dichlormethan bei RT 1h gerührt, die organische Phase 2mal mit Wasser extrahiert und getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) Ausbeute: 3.5 g (98%).  
(ii) Das Produkt wurde in 10 ml Trifluoressigsäure für 20 Minuten gerührt und mit Diethylether ausgefällt und getrocknet, man erhielt NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub> x TFA

(2.1 g, 92%). (iii) 5.2 g (10.7 mmol) FmocLys(Boc)-OH wurden in 50 ml DMF gelöst und 3.53 g (11.0 mmol) TBTU und 2.66 g (22.0 mmol) Collidin zugeben. Nach 1 min gab man 2.0 g (10.7 mmol)  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C=O-(CH}_2\text{)}_6\text{-CH}_3$  x TFA zu und rührt bei Raumtemperatur (RT) 4 h. Nach Extraktion mit Chloroform/Wasser wurde die organische Phase eingeengt, nach säulenchromatographischer Reinigung (Sephadex LH20®) erhielt man 5.0 g (71%) Produkt. (iiii) 3.0 g (4.48 mmol) des Produkts wurden in einer Lösung aus 5 ml Piperidin in 20 ml DMF 20 Minuten gerührt, nach säulenchromatografischer Reinigung (Sephadex LH20®) erhielt man 1.56 g (79%) H-Lys(Boc)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>.

4c) 2.36 g (3.0 mmol) der Verbindung aus Absatz 4a) wurden in 10 ml DMF gelöst und 0.99 g (3.1 mmol) TBTU und 0.75 g (6.2 mmol) Collidin zugeben. Nach 1 Minute gab man 1.3 g (3.0 mmol) der Verbindung aus Absatz 4b) zu und rührte bei RT 4 Stunden. Nach Extraktion mit Chloroform/Wasser wurde die organische Phase eingeengt, nach säulenchromatographischer Reinigung (Sephadex LH20®, MeOH) erhielt man 2.23 g (70%). 0.6 g (0.5 mmol) wurden in einer Mischung aus 9.5 ml TFA, 0.2 ml Wasser und 0.2 ml Triisopropylsilan 3 h bei RT gerührt. Nach Ausfällen mit Diethylether und säulenchromatografischer Reinigung (Sephadex LH20®) erhielt man 0.4 g (91%) Produkt.

4d) 0.35 g (0.41 mmol) 4c, Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub> wurden mit 0.64 g (2.1 mmol) D,L-6,8-Dithiooctanoyl-NHS in DME/Wasser 1:1 (50 ml) bei RT 3 d gerührt, wobei der pH der Lösung auf 7.0 mit Collidin eingestellt wurde, nach säulenchromatographischer Reinigung über Sephadex LH20® (MeOH) erhielt man 0.247 g (57.6 %) der Verbindung 4.

Beispiel 5 Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanoyl-amid)-NH<sub>2</sub>

5a) Ac-Glu(O-tBu)-Glu(O-tBu)-Glu(O-tBu)-Asp(O-tBu)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>

Käufliches 20 g (9.0 mmol, Beladung: 0.9 mmol/g) Amino-methylharz mit Linker Fmoc-4-Methoxy-4'-(carboxypropyl-oxy)benzhydrylamin wurde in einem typischen Festphasensyntheseprotokoll zuerst mit 20% Piperidin in DMF behandelt (2 x 5 Minuten). Nach repetitiver Kopplung mit 15.0 mmol der Aminosäuren Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH (2 x) und Ac-Glu(OtBu)-OH, 15 mmol TBTU, 30 mmol Collidin und Deblockierung mit 20% Piperidin in DMF (2 x 5 Minuten) wurde das Pentapeptidamid mit 100% TFA vom Harz abgespalten und über Sephadex LH20® (MeOH) gereinigt. Ausbeute: 3.97 g (64.9%).

5b) 0.25 g (0.31 mmol) Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys-NH<sub>2</sub> wurden in DME/Wasser 1:1 (50 ml) gelöst der pH mit Collidin auf 7 eingestellt, mit 0.38 g (1.24 mmol) D,L-6,8-Dithiooctanoyl-NHS in bei RT 3d gerührt, nach Einengen und säulenchromatographischer Reinigung über Sephadex LH20® (MeOH) erhielt man 0.10 g (37.7 %) des Endprodukts 5.

Beispiel 6 Ac-Leu-Gly-Asp[NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-CO-Biotin]-Lys( $\epsilon$ -D,L-6,8-Dithiooctanamid)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-octanoylamid

6a) Herstellung von Ac-Leu-Gly-Asp(OtBu)-OH: In einem typischen Festphasensyntheseprotokoll wurden durch repetitiver Kopplung von 20 g (9.8 mmol, Beladung: 0.49 mmol/g) käuflichem H-Asp-chlorotritylharz mit 14.7 mmol der Aminosäuren Fmoc-Gly OH und Ac-Leu-OH, 14.7 mmol TBTU, 29.7 mmol Collidin und Deblockierung mit 20% Piperidin in DMF (2 x 5 min) das Tripeptid aufgebaut, mit 1% TFA in Dichlormethan vom Harz abgespalten und über Sephadex LH20® (MeOH) gereinigt. Ausbeute: 2.56 g (65%).



6b) 1.156 g (3.0 mmol) 6a wurden in 10 ml DMF gelöst und 0.99 g (3.1 mmol) TBTU und 0.75 g (6.2 mmol) Collidin zugegeben. Nach 1 Minute gab man 1.3 g (3.0 mmol) der Verbindung 4b zu und rührte bei RT 4 Stunden. Nach Extraktion mit Chloroform/Wasser wurde die organische Phase eingeeengt, nach säulenchromatographischer Reinigung (Sephadex LH20®, MeOH) erhielt man 1.72 g (70%).

6c) 0.41 g (0.5 mmol) 6b wurden in einer Mischung aus 9.5 ml TFA, 0.2 ml Wasser und 0.2 ml Triisopropylsilan 3 h bei RT gerührt. Nach Ausfällen mit Diethylether und säulenchromatografischer Reinigung (Sephadex LH20®, MeOH) erhielt man 0.38 g (90%) Produkt.

6d) 0.3 g (0.38 mmol) 6c wurden in DME/Wasser 1:1 (50 ml) gelöst, mit Collidin auf pH 7 eingestellt. Man gab 0.23 g (0.76 mmol) D,L-6,8-Dithiooctanoyl-NHS zu und rührte bei RT 2d, nach säulenchromatographischer Reinigung über Sephadex LH20® (MeOH) und präparativer HPLC (Waters Deltaprep, Deltapaksäule C18, 15µm Laufmittel Wasser/Acetonitril/TFA) erhielt man 0.16 g (57.6 %).

6e) 0.1 g (0.12 mmol) 6d wurden in 5ml DMF gelöst und 0.026 g (0.12 mmol) TBTU, 0.029 g (0.24 mmol) Collidin und 5-(Biotinamido)pentylamin (Pierce, Rockport, IL, USA) zugegeben. Man rührte 6h bei RT, engte ein und Reinigung mittels präparativer HPLC (Waters Deltaprep, Deltapaksäule C18, 15µm, Laufmittel Wasser/Acetonitril/TFA ergab 0.069 g (50 %) Endprodukt 6.

Beispiel 7 H-Glu-Asp-Tyr-His-Ser-Leu-Tyr-Asn-Ser-His-Leu-Lys(ε-D,L-6,8-Dithiooctanamid)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-octanylamid

7a) Fmoc-Glu(t-but)-Asp(t-but)-Tyr(t-but)-His(Boc)-Ser(t-but)-Leu-Tyr(t-but)-Asn(Trt)-Ser(t-but)-His(Boc)-Leu-OH In

einem typischen Festphasensyntheseprotokoll wurden durch repetitiver Kopplung von 31 g (15 mmol, Beladung: 0.5 mmol/g) käuflichem H-Leu-chlorotritylharz mit 18.6 mmol der Aminosäuren Fmoc-Glu(t-but)-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(t-but)-OH, Fmoc-Asp(t-but)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(t-But)-OH, Fmoc-Leu-OH in der Reihenfolge der Sequenz am H-Leu-Harz aufgebaut, mit den Reagentien 18.6 mmol TBTU, 37.2 mmol Collidin und Deblockierung mit 20% Piperidin in DMF (2 x 5 min), mit 1% TFA in Dichlormethan vom Harz abgespalten und über Sephadex LH20® gereinigt. Ausbeute: 5.3 g (13%).

7b) 4 g (1.68 mmol) 7a wurden in 20 ml DMF gelöst, 0.393 g (1.68 mmol) TBTU, 0.406 g (3.36 mmol) Collidin und 0.73 g (1.68 mmol) 4b wurden zugegeben und rührte bei RT 4 Stunden. Nach Einengen und nach säulenchromatographischer Reinigung (Sephadex LH20®, MeOH) erhielt man 3.28 g (70%).

7c) 3.0 g (1.05 mmol) 7b werden in einer Mischung aus 95 ml TFA, 2 ml Wasser und 2 ml Triisopropylsilan, 5 g Phenol 6 h bei RT gerührt. Nach Ausfällen mit Diethylether und säulenchromatografischer Reinigung (Sephadex LH20®, MeOH) und Reinigung mittels präparativer HPLC (Waters Deltaprep, Deltapaksäule C18, 15µm, Laufmittel Wasser/Acetonitril/TFA) erhielt man 1.23 g (60%) Produkt.

7d) 1.0 g (0.52 mmol) 7c wurden in DME/Wasser 1:1 (50 ml) gelöst, mit Collidin auf pH 7 eingestellt. Man gab 0.3 g (1.02 mmol) D,L-6,8-Dithiooctanoyl-NHS zu und rührte bei RT 2d, nach säulenchromatographischer Reinigung über Sephadex LH20® (MeOH) wurde das Rohprodukt 10 min mit 5 ml 20% Piperidin/DMF behandelt und nach präparativer HPLC (Waters Deltaprep, Deltapaksäule C18, 15µm, Laufmittel Wasser/Acetonitril/TFA) erhielt man 0.088 g (20%) Endprodukt 7.

Beispiel 8 D,L-6,8-Dithiooctanoylamid-Lys( $\epsilon$ -Asp-Glu-Glu-Glu-Ac)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CH<sub>3</sub>

8a) Herstellung von Boc-Lys-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CH<sub>3</sub>  
(i) 6.4 g (40.0 mmol) Boc-NH-ethylendiamin und 5.4 g (12.5 mmol) Palmitoylchlorid wurden in 200 ml Dichlormethan bei RT 1h gerührt, eingeengt, nach säulenchromatographischer Reinigung (Sephadex LH20®, MeOH) erhielt man 7.9 g (95%) Produkt. (ii) Das Produkt wurde in 100 ml Trifluoressigsäure für 20 Minuten gerührt und mit Diethylether ausgefällt und getrocknet, man erhielt NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CH<sub>3</sub> x TFA (7.8 g, 100%) Rohprodukt. (iii) 2.95 g (12.1 mmol) Boc-Lys-OH wurden in 50 ml DMF gelöst und 2.8 g (12.1 mmol) TBTU und 2.93 g 24.2.0 mmol) Collidin zugegeben. Nach 1 min gab man 5.0 g (12.1 mmol) NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CH<sub>3</sub> x TFA zu und rührte bei Raumtemperatur (RT) 4 h. Nach Einengen und nach säulenchromatographischer Reinigung (Sephadex LH20®, MeOH) erhielt man 5.7 g (90%) Produkt 8a.

8b) H-Lys( $\epsilon$ -Asp-Glu-Glu-Glu-Ac)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CH<sub>3</sub>

1.0 g (0.56 mmol) 4a wurden in 20 ml DMF gelöst, Zugabe von 0.131 g (0.56 mmol) TBTU, 0.141 g (1.12 mmol) Collidin und 0.294 g (0.56 mmol) 8a. Nach Rühren bei 6h RT wurde eingeengt, nach säulenchromatographischer Reinigung (Sephadex LH20®, MeOH) erhielt man 0.54 g (75%) Produkt.

8c) 0.5 g (0.386 mmol) 8b wurden in einer Mischung aus 9.5 ml TFA, 0.2 ml Wasser und 0.2 ml Triisopropylsilan 3 h bei RT gerührt. Nach Ausfällen mit Diethylether und säulenchromatografischer Reinigung (Sephadex LH20®, MeOH) erhielt man 0.251 g (60%) Produkt.

8c) 0.2 g (0.18 mmol) 8b wurden in DME/Wasser 1:1 (50 ml) gelöst, mit Collidin auf pH 7 eingestellt. Man gab 0.11 g (0.36 mmol) D,L-6,8-Dithiooctanoyl-NHS zu und rührte bei RT

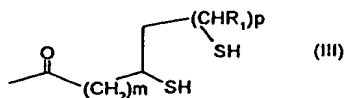
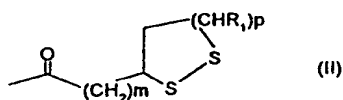
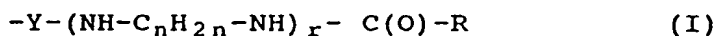
2d, nach säulenchromatographischer Reinigung über Sephadex LH20® (MeOH) und nach präparativer HPLC (Waters Deltaprep, Deltapaksäule C18,15µm, Laufmittel Wasser/Acetonitril/TFA) erhielt man 104 mg (50%) Endprodukt 8.

Beispiel 9 (Ac-Glu-Glu-Glu-Asp-Lys-(ε-6,8-dimercaptooctansäureamid)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C=O-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>)

0.2 g (0.19 mmol) der Verbindung Beispiel 4 wurde in einem Gemisch von 10 ml Wasser und 5 ml gelöst und mit 0.015 g (0.4 mmol) Natriumborhydrid bei 5°C gerührt. Nach 3 h wurde 1 ml Essigsäure zugegeben und die Lösung eingeeengt. Nach präparativer HPLC (Waters Deltaprep, Deltapaksäule C18,15µm, Laufmittel Wasser/Acetonitril/TFA) erhielt man 0.1 g (49%) Endprodukt 9.

Patentansprüche

1. Transportsystemkonjugat als transmembranäres Transportsystem, dadurch gekennzeichnet, dass dieses aus mindestens einer pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksamen Verbindung besteht, und diese Verbindung derart modifiziert wurde, dass sie mindestens einen Substituenten der Formel (I) und mindestens einen an Y gebundenen Substituenten der Formel (II) und/oder (III):



aufweist, worin

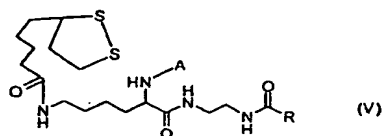
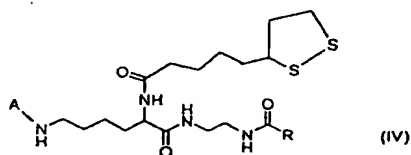
- Y einen Rest einer Aminosäure mit ursprünglich mindestens 3 reaktiven Gruppen oder einen Rest von 2 oder 3 aneinander gebundenen Aminosäuren mit ursprünglich mindestens 3 reaktiven Gruppen, jeweils ausgewählt aus Amino (-NH<sub>2</sub>) und/oder Carboxyl [-C(O)OH], oder einen dreiwertigen Rest eines Trisamins mit 3-8 C-Atomen,  
 $C_nH_{2n}$  -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- oder -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, vorzugsweise -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,  
 r Null, 1 oder 2, vorzugsweise Null oder eins, vorzugsweise 1,  
 R-C(O) den Rest einer gesättigten, einfach oder mehrfach ungesättigten, gegebenenfalls substituierten, (C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>)-Fettsäure,  
 R<sub>1</sub> Wasserstoff oder Alkyl mit 1, 2, 3 oder 4 C-Atomen, vorzugsweise Wasserstoff oder Methyl, vorzugsweise Wasserstoff,

m eine ganze Zahl von 3 bis 8, vorzugsweise 4, 5 oder 6,  
p 1, 2 oder 3, und vorzugsweise 1,  
bedeuten.

2. Transportsystemkonjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Y den Rest von Lysin (Lys), Asparaginsäure (Asp), Glutaminsäure (Glu), Ornithin, D,L  $\alpha,\beta$ -Diaminopropionylsäure, D,L- $\alpha,\gamma$  butyrylaminosäure, Citrullin, Homocitrullin, D,L-2-Amino-Hexandisäure, D,L-2-Aminoheptandisäure, 2-Amino-2 Octandisäure. von zwei aneinandergebundenen Glycinmolekülen (Gly.Gly) oder von aneinandergebundenm Glycin und Alanin (Gly.Ala) oder von Tris(2-aminoethyl)amin bedeutet.
3. Transportsystemkonjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Y den Rest von Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Ornithin, L-2,3-Di-aminopropionsäure, L- $\alpha,\gamma$  butyrylaminosäure, Citrullin, Homocitrullin, L-2-Amino-adipinsäure, L-2-Aminoheptandisäure, L-2-Amino-Octandisäure und vorzugsweise von Lysin, bedeutet.
4. Transportsystemkonjugat nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass der Rest der Formel (I) der Formel  $-Y-NH-CH_2CH_2-NH-C(O)-R$  entspricht.
5. Transportsystemkonjugat nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass der Rest R-C(O)- den Carbonylrest der Buttersäure, Valeriansäure, Capronsäure, Heptansäure, Caprylsäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Arachinsäure,  $\Delta^9$ -Dodecylensäure, Oleinsäure, Linolsäure, Arachidonsäure, Ricinoleinsäure, vorzugsweise den Rest der Caprylsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure oder Stearinsäure, bedeutet.

6. Transportsystemkonjugat nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass der Rest der Formel (II) direkt an eine NH-Gruppe von Y, oder über eine Übergangsgruppe, vorzugsweise über die Gruppe  $-(NH-C_nH_{2n}-NH)-$ , an eine Carbonylgruppe von Y gebunden ist.
7. Transportsystemkonjugat nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Rest der Formel (II) als D,L-6,8-Dithiooctanamidrest, direkt am aminoterminalen Ende der aminoterminalen Seitenkette und/oder an den NH-Rest in  $\alpha$ -Stellung von Y befestigt ist.
8. Transportsystemkonjugat nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass im Rest der Formel (III)  $m = 4$  und  $p = 1$  bedeuten und dieser Rest direkt am aminoterminalen Ende und/oder an den NH-Rest in  $\alpha$ -Stellung von Y befestigt ist.
9. Transportsystemkonjugat nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Verbindung direkt an eine NH-Gruppe oder an eine Carbonylgruppe von Y, gegebenenfalls über eine geeignete Übergangsgruppe, gebunden ist und vorzugsweise am aminoterminalen Ende und/oder an den NH-Rest in  $\alpha$ -Stellung von Y befestigt ist.

10. 10. Transportsystemkonjugat nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, dass dieses der Formel (IV) oder der Formel (V):



entspricht, worin A den Rest der modifizierten pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksamen Verbindung bedeutet.

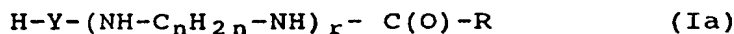
11. Transportsystemkonjugat nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Verbindung einen peptidischen oder nicht-peptidischen Wirkstoffe darstellt.
12. Transportsystemkonjugat nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Verbindung ein Peptid, vorzugsweise eine  $\alpha$ -Aminosäure, oder ein Polypeptid mit vorzugsweise 2-20 Aminosäureeinheiten, vorzugsweise Glu-Glu-Glu-Asp, Glu-Glu-Glu-Asp-Lys, Glu-Glu-Glu-Asp-Ser-Thr-Ala-Leu-Val-Cys, Ala-Glu-Glu-Asp, Glu-Glu-Glu-Glu, Ala-Glu-Glu-Glu, Glu-Glu-Glu-Asp-Ala-Thr-Ala-Leu-Val-Cys, Glu-Glu-Glu-Asp-Leu-Thr-Ala-Leu-Val-Cys, Leu-Gly-Asp, bedeutet.



13. Transportsystemkonjugat nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid ein Oligopeptid mit einem mittleren Molekulargewicht von bis zu 20kDa darstellt, vorzugsweise mit den Sequenzen Glu-Glu-Glu-Asp, Glu-Glu-Glu-Asp-Lys, Leu-Gly-Asp, Glu-Asp-Tyr-His-Ser-Leu-Tyr-Asn-Ser-His-Leu, sowie analoge Sequenzen, sowie entsprechende Salze, vorzugsweise mit TFA, oder Acetate oder Propionate, oder Salze gebildet mit  $H_3PO_4$  oder HBr.
14. Transportsystemkonjugat nach den Ansprüchen 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid mit Schutzgruppen versehen ist, welche an vorhandenen reaktiven Gruppen befestigt sind.
15. Transportsystemkonjugat nach einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Verbindung ein Vitamin, Hormon oder Antibiotikum darstellt, vorzugsweise Vitamin A, Vitamin B1, Vitamin B2, Vitamin B6, Vitamin C, Vitamin D, Vitamin E und Vitamin K, Adiuretin, Oxytocin, ein Melanozyten-stimulierendes Hormon, Calcitonon, ein Glucocorticoid, ein Androgen und Östrogen.
16. Transportsystemkonjugat nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, dass dieses mit Oligonucleotiden-Analoga konjugiert ist.
17. Verfahren zur Herstellung eines Transportsystemkonjugats nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, dass man eine an sich bekannte pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksame Verbindung, vorzugsweise eine Aminosäure mit beliebiger aminoterminaler Seitenkette und einem carbonylterminierten Ende, über eine Amidstruktur mit einer geeigneten, dem Rest

-Y- entsprechenden Ausgangsverbindung, in an sich bekannter Weise an deren aminoterminalen Ende und/oder carboxyterminalen Ende direkt oder über einen Linker verknüpft, wobei man gegebenenfalls vorher oder nachher eine oder mehrere Schutzgruppen einfügt, und man anschliessend das erhaltene Zwischenprodukt in an sich bekannter Weise mit den geeigneten dem Rest -C(O)R und den Formeln (II) und/oder (III) entsprechenden Ausgangsverbindungen zum Transportsystemkonjugat umsetzt.

18. Verfahren zur Herstellung eines Transportersystemkonjugats nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, dass man zuerst die Verbindung der Formel (Ia):



herstellt, welche mit den Resten der Formeln (II) und/oder (III) sowie der pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksamen Verbindung noch nicht verknüpft ist, und anschliessend die Verbindung der Formel (Ia) mit den geeigneten Ausgangsverbindungen der Reste der Formeln (II) und/oder (III) sowie der pharmazeutisch und/oder kosmetisch wirksamen Verbindung in an sich bekannter Weise umsetzt.

19. Verwendung der Transportsystemkonjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 16, für topische und transdermale Anwendungen in der Dermatologie, Kosmetik oder für systemisch wirkende Pharmaka.
20. Verwendung der Transportsystemkonjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 16, zur Bekämpfung von Hautalterung, Entzündungen, Cellulitis, Psoriasis, Antimelanoma, Arthritis, Akne, Neurodermitis, Ekzeme, Paradontitis oder Verbrennungen, als Radikalfänger, Hautbräuner

oder Hautbleicher, zur Haarwuchsförderung oder Haarwuchshemmung, als Immunstimulatoren, zum Transport von Regenerierungswirkstoffen oder Antibiotika oder in der Verwendung auf dem Gebiet der Wundheilung.

21. Verwendung eines Transportsystems gemäss einem der Ansprüche 1 bis 16 für die Herstellung von Heilmitteln für topische und transdermale Anwendungen in der Dermatologie, Kosmetik oder für systemisch wirkende Pharmaka.
22. Heilmittel, welches ein Transportsystem gemäss einem der Ansprüche 1 bis 16 enthält, für topische und transdermale Anwendungen in der Dermatologie, Kosmetik oder für systemisch wirkende Pharmaka, vorzugsweise zur Bekämpfung von Hautalterung, Entzündungen, Cellulitis, Psoriasis, Antimelanoma, Arthritis, Akne, Neurodermitis, Ekzeme, Paradontitis oder Verbrennungen, als Radikalfänger, Hautbräuner oder Hautbleicher, zur Haarwuchsförderung oder Haarwuchshemmung, als Immunstimulatoren, zum Transport von Regenerierungswirkstoffen oder Antibiotika oder in der Verwendung auf dem Gebiet der Wundheilung.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CH 99/00567

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K47/48 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | DATABASE WPI<br>Section Ch,<br>Derwent Publications Ltd., London, GB;<br>Class B00, AN 66-28640F<br>XP002111984<br>& JP 42 015942 B (FUJISAWA PHARM CO LTD)<br>abstract   |                       |
| Y          | CHAPONNIER C. ET AL.: "The specific<br>NH <sub>2</sub> -terminal sequence Ac-EEED of<br>alpha-smooth muscle actin plays a role in<br>polymerization in vitro and in vivo."<br>J. CELL BIOL.,<br>vol. 130, no. 4, August 1995 (1995-08),<br>pages 887-895, XP002111981<br>cited in the application<br>abstract | 1-22                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 March 2000

Date of mailing of the international search report

20/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern. Appl. No.  
 PCT/CH 99/00567

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| X  | WO 95 08564 A (INST EUROP DE BIOLOG<br>CELLULAIRE ;DUSSOURD D HINTERLAND LUCIEN<br>(FR);) 30 March 1995 (1995-03-30)<br>claims  | 1-22                  |
| Y  | EP 0 618 231 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)<br>5 October 1994 (1994-10-05)<br>claims; examples  | 1-22                  |
| A  | DATABASE CHEMABS 'Online!<br>CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,<br>OHIO, US<br>AN=126:99664,<br>JAERLEBARK, LEIF ET AL: "Peptidyl<br>conjugates of adenosine 5'-carboxylic acid<br>synthesized and evaluated as ligands for<br>P2 purinoceptors"<br>retrieved from STN<br>Database accession no. 126:99664 CA<br>XP002111982<br>abstract<br>& BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1996),<br>229(2), 363-369,1996,      |                       |
| A  | DATABASE EMBASE 'Online!<br>ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL<br>SEN C.K. ET AL: "A positively<br>charged.alpha.-lipoic acid analogue with<br>increased cellular uptake and more potent<br>immunomodulatory activity."<br>retrieved from STN<br>Database accession no. 1998309822<br>XP002111983<br>abstract<br>& BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH<br>COMMUNICATIONS, (18 JUN 1998) 247/2<br>(223-228)., |                       |
| X  | FR 2 691 465 A (PF MEDICAMENT)<br>26 November 1993 (1993-11-26)<br>claims   | 1-22                  |
| Y  | US 3 345 368 A (BENJAMIN, ARTHUR LOUIS)<br>3 October 1967 (1967-10-03)<br>column 2, line 15 - line 51   | 1-22                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Patent Application No

PCT/CH 99/00567

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)   | Publication<br>date  |
|---|---------------------|--|--|
| JP 42015942 B                             |                     | NONE   |  |
| WO 9508564 A                              | 30-03-1995          | FR 2710340 A<br>AT 178904 T<br>AU 7785994 A<br>CA 2149925 A<br>DE 69417868 D<br>EP 0669938 A<br>JP 8503963 T<br>US 5830994 A | 31-03-1995<br>15-04-1999<br>10-04-1995<br>30-03-1995<br>20-05-1999<br>06-09-1995<br>30-04-1996<br>03-11-1998 |
| EP 0618231 A                              | 05-10-1994          | DE 4310142 A<br>DE 59408322 D<br>ES 2133436 T<br>JP 2777330 B<br>JP 6322000 A<br>US 5514559 A                                | 06-10-1994<br>08-07-1999<br>16-09-1999<br>16-07-1998<br>22-11-1994<br>07-05-1996                             |
| FR 2691465 A                              | 26-11-1993          | NONE   |  |
| US 3345368 A                              | 03-10-1967          | NONE   |  |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/CH 99/00567

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 A61K47/48 A61K7/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A          | DATABASE WPI<br>Section Ch,<br>Derwent Publications Ltd., London, GB;<br>Class B00, AN 66-28640F<br>XP002111984<br>& JP 42 015942 B (FUJISAWA PHARM CO LTD)<br>Zusammenfassung  |                    |
| Y          | CHAPONNIER C. ET AL.: "The specific<br>NH2-terminal sequence Ac-EEED of<br>alpha-smooth muscle actin plays a role in<br>polymerization in vitro and in vivo."<br>J. CELL BIOL.,<br>Bd. 130, Nr. 4, August 1995 (1995-08),<br>Seiten 887-895, XP002111981<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Zusammenfassung | 1-22               |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderschaftlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderschaftlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. März 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

20/03/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentsaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 61 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nales Aktenzeichen

PCT/CH 99/00567

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEBEHENE UNTERLAGEN |   |                    |
|--|---|--------------------|
| Kategorie*   | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
| X  | WO 95 08564 A (INST EUROP DE BIOLOG<br>CELLULAIRE ;DUSSOURD D HINTERLAND LUCIEN<br>(FR);) 30. März 1995 (1995-03-30)<br>Ansprüche   | 1-22               |
| Y  | EP 0 618 231 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)<br>5. Oktober 1994 (1994-10-05)<br>Ansprüche; Beispiele   | 1-22               |
| A  | DATABASE CHEMABS 'Online!<br>CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,<br>OHIO, US<br>AN=126:99664,<br>JAERLEBARK, LEIF ET AL: "Peptidyl<br>conjugates of adenosine 5'-carboxylic acid<br>synthesized and evaluated as ligands for<br>P2 purinoceptors"<br>retrieved from STN<br>Database accession no. 126:99664 CA<br>XP002111982<br>Zusammenfassung<br>& BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1996),<br>229(2), 363-369,1996,       |                    |
| A  | DATABASE EMBASE 'Online!<br>ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL<br>SEN C.K. ET AL: "A positively<br>charged.alpha.-lipoic acid analogue with<br>increased cellular uptake and more potent<br>immunomodulatory activity."<br>retrieved from STN<br>Database accession no. 1998309822<br>XP002111983<br>Zusammenfassung<br>& BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH<br>COMMUNICATIONS, (18 JUN 1998) 247/2<br>(223-228).., |                    |
| X  | FR 2 691 465 A (PF MEDICAMENT)<br>26. November 1993 (1993-11-26)<br>Ansprüche   | 1-22               |
| Y  | US 3 345 368 A (BENJAMIN, ARTHUR LOUIS)<br>3. Oktober 1967 (1967-10-03)<br>Spalte 2, Zeile 15 - Zeile 51  | 1-22               |



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH 99/00567

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| JP 42015942 B                                      |                               | KEINE                             |                               |
| WO 9508564 A                                       | 30-03-1995                    | FR 2710340 A                      | 31-03-1995                    |
|  |                               | AT 178904 T                       | 15-04-1999                    |
|  |                               | AU 7785994 A                      | 10-04-1995                    |
|  |                               | CA 2149925 A                      | 30-03-1995                    |
|  |                               | DE 69417868 D                     | 20-05-1999                    |
|  |                               | EP 0669938 A                      | 06-09-1995                    |
|  |                               | JP 8503963 T                      | 30-04-1996                    |
|  |                               | US 5830994 A                      | 03-11-1998                    |
| EP 0618231 A                                       | 05-10-1994                    | DE 4310142 A                      | 06-10-1994                    |
|  |                               | DE 59408322 D                     | 08-07-1999                    |
|  |                               | ES 2133436 T                      | 16-09-1999                    |
|  |                               | JP 2777330 B                      | 16-07-1998                    |
|  |                               | JP 6322000 A                      | 22-11-1994                    |
|  |                               | US 5514559 A                      | 07-05-1996                    |
| FR 2691465 A                                       | 26-11-1993                    | KEINE                             |                               |
| US 3345368 A                                       | 03-10-1967                    | KEINE                             |                               |